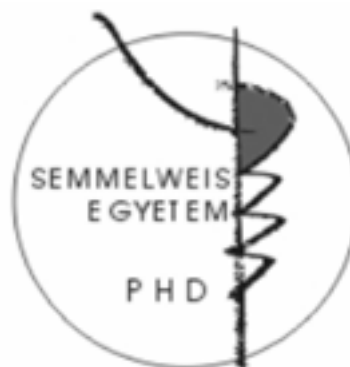


A foszfoglicerátkináz szerkezetváltozásainak vizsgálata folding és amiloidképződés során

Doktori tézisek

Agócs Gergely

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Osváth Szabolcs egyetemi adjunktus, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Kardon Tamás egyetemi adjunktus, Ph.D.
Dr. Grama László egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Ligeti Erzsébet egyetemi tanár, D.Sc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Geiszt Miklós egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Nagy László egyetemi docens, Ph.D.

Budapest
2012

1. Bevezetés

A *fehérjék* változatos fizikai-kémiai tulajdonságú aminosavakból felépülő heteropolimerek, melyek a legkülönbébb funkciókat töltik be az élő szervezetekben. Egy adott szerep betöltéséhez azonban nem csak a meghatározott kémiai struktúrára (*aminosavszekvenciára*), hanem a működést lehetővé tevő konformációra (*térszerkezetre*) is szükség van. Az ilyen térszerkezetek csupán egy *szűk halmazát* jelentik az elvileg lehetséges fehérjekonformációknak, a természetben mégis csodálatra méltó módon rövid idő alatt, alapvetően külső segítség nélkül alakulnak ki a *folding* (fehérjegombolyodás) során; a létrejövő natív struktúrát elsősorban az oldalcsoportok közötti kölcsönhatások stabilizálják. Némikor mégis előfordul, hogy hibás szerkezetek jönnek létre (*misfolding*), melyek aggregációra hajlamosak, és jól meghatározott, β -redőkben gazdag fonalak, *amiloid fibrillumok* alakulnak ki. Az amiloid fibrillumokat a fehérjegerinc peptid-csoportjai közötti hidrogénhidak stabilizálnak, és rendkívül ellenállnak a külső behatásoknak. E szerkezetek megjelenését számos betegségben leírták (*amiloidózisok*), melyek között megtalálhatók a fejlett társadalmakban gyakori időskori degeneratív megbetegedések, és kivétel nélkül *gyógyíthatatlanok*. Mindez a kutatások homlokterébe emelte az amiloidok vizsgálatát.

Az amiloidokat először bizonyos betegségben szenvedő emberektől vett szövetmintákban azonosították, ahol bebizonyosodott, hogy adott betegség esetén csak egyetlen, ritkán néhány fehérje válik amiloiddá. Később sikerült e fehérjékből mesterségesen is amiloidokat képezni. Újabban számos nem patogén fehérjét át tudtak amiloiddá alakítani (például az élesztő foszfoglucérátkináz enzimet, PGK), így ma már általánosan elfogadott az a szemlélet, hogy – megfelelő körülmények között – valamennyi fehérje képes amiloidot formálni. Mindez lehetővé teszi az amiloidképződés vizsgálatát nem patogén fehérjéken is.

A hibás térszerkezet kialakulásának első lépése, hogy a natív térszerkezet destabilizálódik. Mivel a destabilizált szerkezet még rendelkezik a helyes

szerkezetre jellemző elemek egy részével, ezért a natív térszerkezet befolyásolhatja az amiloidképződés kinetikáját is, ami pedig meghatározza a kialakuló amiloid szerkezetét, ami hatással lehet a rezisztenciára.

Az amiloidok ellenálló-képessége ellenére léteznek módszerek, melyekkel szétszedhetők az aggregátumok. Mivel a kis oligomerek fertőzőképesség szempontjából a legveszélyesebbek, fontos megvizsgálni, hogy milyen hatásokkal történik a diszaggregáció és hogy sikerül-e helyreállítani a natív szerkezetet.

A denaturált fehérjéből kiinduló folding, illetve amiloidképződés az olvadt gombóc elnevezésű intermediér termékig azonos útvonalon halad. A denaturált-intermediér átalakulás leírására sikeresen használt modell az átalakulásnak véges számú hierarchikus szintjét feltételezi. A továbbalakulás folding esetében jól leírható egy olyan kinetikával, ami egyetlen energiagát átlépésével számol. Az aggregáció irányába történő továbbalakulás leírható a Smoluchowski-féle aggregációs modellel, amely méretfüggetlen sebességi állandókkal számol az aggregáció részlépései során. Megkönnyíti e módszerek alkalmazását, hogy mindegyik számolható a fluoreszcenciaspektroszkópiával nyert intenzitásértékek időbeli változásából. A kinetika feltárása közelebb vihet azon tényezők megértéséhez, amelyek meghatározzák egy fehérje esetén azt, hogy a konformációváltozások a folding vagy az amiloidképződés irányába haladjanak.

2. Célkitűzések

A Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetben nagy hagyománya van a fehérjeszerkezeti kutatásoknak, legyen szó kísérletes vagy számítógépes szimulációról. A munkacsoport és különösen témavezetőm tapasztalata, valamint a helyben és együttműködéseknek köszönhetően rendelkezésre álló műszerpark lehetővé tette a bevezetőben felvázoltakkal kapcsolatos kérdések megválaszolását. Habár kutatásaim alapkutatásnak tekintendők, az amiloidok képződésének és szétesésének vizsgálatával, e folyamatok irányát és kinetikáját meghatározó paraméterek megismerésével közelebb jutunk a farmakológiai

releváns támadáspontok azonosításához, ami megnöveli az esélyt az oki terápia kidolgozására.

Célkitűzéseimet a következő pontokban foglalom össze:

- I. A PGK doménjei közötti kölcsönhatások hatásának vizsgálata az amiloidképződésre.
 - I.1. Amiloidok létrehozása a fehérjerendszer elemeiből: a fehérjedoménokból és a triptofánmutáns teljes fehérjékből.
 - I.2. Alkalmas matematikai modell keresése az amiloidképződés leírására az azt kísérő fluoreszcenciaváltozás mint jel alkalmazásával.
 - I.3. Az izolált domének és a teljes fehérje amiloidképzésének összevetése.
- II. Natív fehérje visszanyerése a PGK-ból létrehozott amiloidfibrillumokból.
 - II.1. Amiloid előállítás PGK-ból és az amiloiddá alakítás hatásfokának megállapítása.
 - II.2. Alkalmas körülmények keresése a PGK-amiloidok tökéletes elbontásához és a natív fehérje visszanyeréséhez.
 - II.3. A kiindulási és a visszanyert fehérje biológiai egyenértékűségének vizsgálata fizikai és biokémiai módszerekkel.
 - II.4. A működőképes fehérje visszanyerési hatásfokának meghatározása.
- III. Azon folyamatok kinetikájának vizsgálata, melynek során a savval denaturált PGK natív, illetve amiloid szerkezetté alakul.
 - III.1. Olyan oldatkörülmények létrehozása, melyben egyetlen paraméter megváltoztatásával befolyásolható, hogy a savval denaturált PGK natív vagy amiloidszerkezetté alakuljon.
 - III.2. A kialakuló szerkezet meghatározása a paraméter különféle értékeinél.

- III.3. Matematikai módszer keresése a natív szerkezet és az amiloid kialakulásának leírásához valamely spektroszkópiailag mérhető jel felhasználásával.
- III.4. A natív szerkezet és az amiloid képződési kinetikájának elemzése a modell segítségével megállapított paraméterek alapján, különös tekintettel a folyamatok esetleges közös lépéseire, a szétválási pontra és a folyamat irányát megszabó tényezők azonosítására.

3. Módszerek

A mérésekhez használt élesztő foszfoglicerátkináz fehérjét BL21(DE3)pLysS típusú E. coli sejtekben (Novagen) fejeztem ki. A fehérje génjét pET28a típusú plazmid tartalmazta. Fehérjetisztításhoz ÄKTApurifier (GE Healthcare) folyadékkromatográfiás rendszert használtam, az oszloptöltet nikkelaaffinitásos Ni-NTA Superflow (Qiagen) gyanta volt. A fehérjetartalmú frakciókat azonosítás végett poli(akrilamid) gélen (Invitrogen) futtattam, a beazonosított PGK-frakciókat egyesítés után egy nyomáscellában, regenerált cellulózmembránnal (Millipore) végzett ultrafiltrálással betöményítettem, majd membrán dialízissel (Carl Roth) vittem a méréshez szükséges oldatközegbe.

A domén-kölcsönhatások vizsgálatához a sósavban denaturált fehérjéhez 200 mM NaCl-t adva indítottam el az amiloidképződést. A natívfluoreszcencia-spektrumokat luminométeren (JobinYvon) vettem fel (gerjesztés: 295 nm), a kapott spektrumokból a 310–320 nm és a 360–370 nm közötti tartományok integráljainak arányát ábrázoltam az idő függvényében, és elvégeztem az illesztést a Smoluchowski-féle egyenlettel. Az illesztéseket valamennyi esetben a Mathematica (Wolfram Research) szoftverrel végeztem.

Az aktivitás helyreállításához a fehérjét először a fent említett módon amiloiddá alakítottam, és elvégeztem több, az amiloidok azonosítására szolgáló vizsgálatot: a cirkulárisdicroizmus-spektrumot CD-spektrométeren (JASCO 700) vettem fel 300–650 nm között 10 cm fényút, 1 nm lépésköz, 2 nm detektálási résszélesség mellett 50 nm/perc sebességgel; a thioflavin-T

fluoreszcenciaspektrumot 20 μM -os festékkoncentráció mellett 450 nm-nél (4 nm sávszélesség) végzett gerjesztéssel és 458–530 nm közötti detektálással (2 nm-es sávszélesség, 1 nm-es lépésköz, 2 nm/s lépési sebesség) vettem fel; az aggregátumok méreteloszlását házi építésű fényszórásmérőn határoztam meg; az amiloidokról elektronmikroszkópos (Hitachi 7100) felvételek is készültek. A sókoncentráció lecsökkentése, majd a pH natív tartományba emelése után a bioekvivalenciát az átalakulási hőmérséklet kalorimetriás (MicroCal VP-DSC) meghatározásával, a visszanyert mennyiséget enzimaktivitás-méréssel határoztam meg, ahol a $3\text{-foszfoglicerát} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{PGK}} 1,3\text{-biszfoszoglicerát} + \text{ADP}$ és az $1,3\text{-biszfoszoglicerát} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{GAPDH}} \text{gliceraldehyd-foszfát} + \text{NAD}$ kapcsolt reakciókat használtam fel, a katalitikus sebességet a NADH fogyásából számoltam, majd ebből határoztam meg a maximális katalitikus sebességet és a Michaelis-állandót.

A natív és amiloid konformációs útvonalak tanulmányozásához a savdenaturált fehérjét 2–7 pH-tartományban lévő értékre állított sós (0,2 M) citrát–foszfát-pufferbe (10–10 mM) kevertem 1 : 10 arányban + 4 °C-on. A 1 ms – 50 s időskálán történt eseményeket stopped-flow keveréssel indított saját-(triptofán-)fluoreszcencia-méréssel (Applied Photophysics PiStar-180) vizsgáltam (gerjesztés 295 nm, gerjesztési résszélesség 5 nm, detektálás 320 nm fölött). A 30–1800 s időtartamon kézikeveréssel indított sajátfluoreszcencia-méréseket (Horiba Jobin-Yvon Fluorolog-3) végeztem (gerjesztés 295 nm, gerjesztési résszélesség 0,25 nm, detektálás 355 nm, detektálási résszélesség 12 nm). A két napig terjedő időtartamú sajátfluoreszcencia-mérésekhez ugyanezen a készüléken spektrumsorozatokot vettem fel (gerjesztés 295 nm, gerjesztési sávszélesség 1 nm, detektálás 305–400 nm, detektálás lépésköze 1 nm, detektálás sebessége 1 nm/s, detektálási sávszélesség 1,5 nm), és a mért tartományon vett összintenzitást használtam fel a kiértékeléshez. A fenti sajátfluoreszcencia-méréseken túl 20 μM tioflavin-T oldat fluoreszcenciaspektrum-változását is mértem (gerjesztés 450 nm, gerjesztési résszélesség 4 nm, detektálás 458–530 nm, detektálási résszélesség 2 nm, detektálási lépésköz 1 nm, detektálási sebesség 2 nm/s), a 2625 μl festékoldat,

majd a 100 μ l minta hozzáadása utáni keverék spektrumainak összintenzitás-arányát használtam a kiértékeléshez.

4. Eredmények és következtetések

Munkám során főként spektroszkópai módszerek segítségével széles időtartományban és változatos körülmények között vizsgáltam a modellfehérjének választott élesztő-foszfoglicerátkináz térszerkezetének változásait és e változások kinetikáját. Az elvégzett mérések kiértékelésére és elemzésére alapozva a következő megállapítások tehetjük:

I.1. A foldingegységek közötti kölcsönhatások vizsgálatára létrehozott *fehérjerendszer valamennyi tagja*, tehát mind a doménjeik egyikében triptofánt hordozó teljes fehérjemutánsok, mind az önmagukban álló, szintén egyetlen triptofánt tartalmazó doménmutánsok *képesek amiloidfibrillumokká aggregálódni*, amihez *megfelelő* a vad típusú PGK amiloidképzéséhez használt 200 mM NaCl-ot tartalmazó pH = 2-es sósavoldat. Az amiloidképződés lezajlásához *hasonló nagyságrendű idő* kellett (mintegy 5 nap), mint amennyi a vad típusú fehérjénél. Az amiloidképződést valamennyi esetben *elektronmikroszkópos felvételek* bizonyítják.

I.2. A Smoluchowski-féle koagulációs egyenlet módosított változata, mely változóként a *koagulációs időállandót* és a *kritikus monomerszámot* tartalmazza, a vad típusú fehérje mellett a négy mutánsból háromra is alkalmazni tudtam, vagyis mindazon esetekben, ahol az amiloidképződést a *fluoreszcenciaspektrum számottevő eltolódása* kísérte. A hosszútávú fluoreszcenciamérést kísérő *intenzitásingadozásból* adódó problémákat a spektrum alakját figyelembe vevő, *eltolódásra érzékeny képlettel* küszöböltem ki. A fluoreszcencia megváltozását egy kritikus monomerszám feletti aggregátumnál *ugrásszerűnek* feltételező modellel valamennyi esetben *jó egyezést mutattak* a mérési eredmények.

I.3. Az izolált *domének* és az azonos pozícióban jelölt *teljes fehérjék* fluoreszcenciaváltozása között *határozott eltérések figyelhetők meg*, amikből

eltérő kinetikájú folyamatokra következtethetünk. Míg az izolált *N-domén* gyakorlatilag *nem jelez változást*, addig *a másik három mutáns* fluoreszcenciaspektruma a vad típusnál tapasztalthoz hasonló *eltolódást mutat a rövidebb hullámhosszak irányába*. Míg a *koagulációs időállandókat* összevetve *ekvivalens* értékeket tapasztalunk, addig a *kritikus monomerszám* az izolált C-domén estében *jelentősen eltér* a mutáns vagy vad típusú teljes fehérjékétől. Összességében megállapítható, hogy *a teljes fehérjék doménjei* sokkal *összehangoltabb kinetikával* alakulnak amiloiddá, mint az izolált domének, ami a távolabbi csoportok közötti kölcsönhatások hiányával magyarázható. A kölcsönhatások hiánya nemcsak a kinetikákra, hanem a *végső szerkezetekre* is hatással vannak.

II.1. A PGK amiloiddá alakítására használt klasszikus módszer (pH = 2 HCl-oldat, 200 mM NaCl) hatékonyságát számos, eltérő elvre épülő módszerrel elemeztem. Az elektronmikroszkópos felvétel, a tioflavin-T oldatában megnövekedett fluoreszcencia, a kongóvírös jelenlétében kialakuló jellegzetes CD-spektrum mind megerősítette a β -redős amiloidstruktúra jelenlétét. A dinamikus fényszórással nyert részecskeméreteloszlás-függvény arra ad bizonyítékot, hogy a jelenlévő fehérje több mint 99%-a egyetlen aggregátumféleség formájában van jelen. Az amiloidkimutatási módszerek pozitivitása és a méreteloszlási függvény együttesen igen erős bizonyíték arra, hogy a fehérje gyakorlatilag teljes mértékben amiloiddá alakult.

II.2. Az amiloidok diszaggregációja és az alkotó fehérjemolekulák primer szerkezeti épségének megőrzése egy kétlépéses folyamattal mutatkozott lehetségesnek: elsőként sómentes pH = 2 sósavoldattal szembeni dializálással denaturált fehérjemonomereket nyertem, majd ezeket natív körülmények közé juttatva bekövetkezett a natív szerkezetet eredményező refolding. Más módszerek, mint például a közvetlen natív körülmények közé hígítás nem mutatkoztak hatékonyak.

II.3. A kiindulási és a visszanyert fehérje biológiai egyenértékűségére enzimkinetikai és termoanalitikai bizonyítékokat is sikerült felmutatnom. A kinetikai vizsgálatok bizonyították, hogy a visszanyert preparátum katalizálja a

3-foszfoglicerát + MgATP \longleftrightarrow 1,3-biszfoszfoglicerát + MgADP reakciót, ami a bioekvivalencia elsődleges követelménye. A kiindulási és a visszanyert fehérje átalakulási hőmérséklete hibahatáron belül azonos volt, ami a két fehérje szerkezeti (ideértve a térszerkezetet is) azonosságát támasztja alá.

II.4. A PGK-amiloidok növekedése és diszaggregációja az élettani viszonyokhoz képest szélsőséges (bár nem irreális) viszonyok között történt. Ennek ellenére az enzimkinetikai mérésekkel meghatározott aktív enzim hányada a sokkal kevésbé destruktív refolding kísérleteknél tapasztalt arányok alsó tartományába esik. Tehát nem csak az amiloidba zárt fehérje helyreállításának hatásfokát sikerült meghatároznom, de azt is megállapíthattam, hogy ez a hatásfok a PGK-refoldinghatásfokával összemérhető érték.

III.1. A sósavval (pH = 2) denaturált PGK-t 200 mM NaCl-ot is tartalmazó pH = 2 HCl-oldatba juttatjuk, akkor néhány nap alatt amiloiddá alakul. Ha NaCl-ra nézve ugyanekkora koncentrációjú, de pH = 7,0 oldatba juttatjuk a fehérjét, a natív szerkezet áll helyre. Így lényegében egyetlen paraméter, a pH modulálásával megválaszthatjuk a savdenaturált fehérje konformációváltozásának irányát. A névleges pH keveredésből adódó változását a vizsgált pH tartományban jól pufferelő többértékű savak sóinak hozzáadásával csillapítottam.

III.2. Spektroszkópiai bizonyítékok alapján kijelenthető, hogy a 7-5 pH tartományon a natív szerkezet kialakulásához vezető folding a kedvezményezett, míg 4-2 tartományban az amiloidfibrillumokat eredményező misfolding és aggregáció volt az előnyben részesített konformáció. A fluoreszcenciaváltozások időfüggése alapján megállapítható, hogy a natív szerkezet kialakulása pH = 7-nél, míg az amiloid kialakulása pH = 2-nél a leggyorsabb.

III.3. A fluoreszcencia jelet – bizonyos peremfeltételek megszabásával – alkalmassá tettem a fehérjék szerkezetváltozásának numerikus nyomonkövetésére. A sávval denaturált–intermedier átalakulásra minden vizsgált pH-n alkalmazni tudtam a véges szintű hierarchikus energiefelszín-modellt, amelyre a korábban a folding leírásánál használt nemexponenciális függvényeket illesztettem. A monomolekuláris reakciónak feltett intermedier–natív átalakulást

egyszerű exponenciális egyenlettel írtam le. Az intermedier–amiloid-transzformációt a Smoluchowski-féle méretfüggetlen koagulációs egyenlettel írtam le.

III.4. A hiperfluoreszcens köztitermék valamennyi pH-n kialakul a vizsgált körülmények között, mindenesetben a hierarchikus energiaszint követve, bár változó sebességgel. Ezen átmenet maximális sebességét a 3,5-ös pH-értéken éri el. A hiperfluoreszcens köztitermék továbbalakulása 7-hez közelebbi pH-kon egy egylépéses folyamatban juttat el a natív szerkezetig. Az alacsonyabb pH-kon a méretfüggetlen koagulációs kinetika dominál, amely végül az amiloidállapotba vezet el. A folding és az amiloidképződés tehát a hiperfluoreszcens intermedier kialakulásáig hasonló útvonalon jár, de az energiaszinten elhelyezkedő potenciálgödrök mennyisége és mélysége függ a pH-tól. Ezután továbbalakulva a fehérje két útvonal közül alacsonyabb pH-kon az amiloidképződést, magasabb pH-kon a natív szerkezetbe hajtogatódást választja. Az útvonalválasztás kifejezetten vagylagos, foldingot és amiloidképződést egyidejűleg, azonos pH-n nem tapasztaltunk, a reakcióirány termodinamikai kontroll alatt áll.

5. Összefoglaló

Az Alzheimer-kór, Parkinson-kór vagy a fertőző szivacsos agysorvadás napjaink ismert gyógyíthatatlan betegségei, melyek az amiloidózisnak nevezett betegségek csoportjába tartoznak. E betegségek közös vonása a hatékony oki terápia hiányán kívül a fehérje egy nem élettani formájának, az amiloidnak a megjelenése. Az amiloidok rendkívül nagy ellenállóképességükről ismert fehérjeaggregátumok, melyekben domináns a β -redős szerkezet, amit a fehérje gerincatomjai között létrejövő hidrogénkötések tesznek stabilá.

Növekvő klinikai jelentőségük miatt az amiloid aggregátumok az élettudományi kutatások homlokterében helyezkednek el. E kutatások részét képezik azok a biofizikai jellegű vizsgálódások, melyek a fehérjék amiloidképzési hajlamának okát, az amiloidképződés kinetikáját, az amiloidok

stabilitását és esetleges diszaggregációjuk lehetőségeit kutatják.

Kutatásaim során spektroszkópai és biokémiai módszerek segítségével vizsgáltam egy kedvelt modellfehérje, az élesztő foszfoglicerátkináz viselkedését. Megállapítottam, hogy a fehérjehajtogatódás során szerephez jutó domének befolyásolják az amúgy szekvenciafüggetlen kapcsolódások létrejöttét az amiloid aggregációja során. A hatásokat az amiloidképződés kinetikáját leíró függvény paraméterei is jól mutatják.

Sikeresen elvégeztem a foszfoglicerátkinázból előállított amiloidok diszaggregációját, majd a natív, enzimatikusan aktív fehérje visszanyerését, továbbá a visszaalakítás hatásfokának meghatározását is: a fehérjéből létrehozott amiloidot sikerült egyedi fehérjemolekulákra diszaggregálnom, majd a monomer fehérjéből ismét működőképes enzimet kialakítanom.

Végül a savban reverzibilisen denaturált fehérje folding és amiloidképződés felé is irányítható útját vizsgáltam. Sikerült egy olyan vizsgálati rendszert létrehoznom, melyben csupán egyetlen változó, a pH modulálásával megváltoztatható a fehérjeszerkezet-alakulás iránya. E rendszer segítségével megállapítottam, hogy a vizsgált körülmények között a fehérjeszerkezet alakulásának útját a termék (amiloid vagy natív fehérje) energiatartalma szabja meg, vagyis a folyamatok termodinamikai kontroll alatt állnak.

6. Summary

Alzheimer's disease, Parkinson's disease and transmissible spongiform encephalopathies are well known incurable illnesses and are member of the so called amyloidosis disease group. Besides the lack of effective causal therapy, they share the property of featuring the deposition of a non-physiologic protein structure: amyloid. Amyloids are protein aggregates known for their exceptional resistance. Amyloid structure is dominated by β -sheets that are stabilized by hydrogen bonds between the atoms of the polypeptide backbone.

Their increasing clinical significance moved the study of amyloid aggregates to the forefront of life science research. An important part of these

investigations are the biophysical experiments searching for the cause of the tendency of proteins to form amyloid, the kinetics of amyloid formation, the stability of amyloids, and the eventual possibility to disaggregate amyloids.

Throughout my investigations, I applied spectroscopic and biochemical methods to gain a deeper insight into the behavior of yeast phosphoglycerate kinase, a popular model protein. I have concluded that the structural domains that originally play role in the formation of the sequence dependent native structure also influence the development of the otherwise sequence-independent secondary bonds during amyloid aggregation. The effects are also demonstrated by the parameters of the function describing the kinetics.

I conducted successful experiments to disaggregate amyloids formed of phosphoglycerate kinase, and furthermore, to restore the enzymatically active protein, as well as to characterize the efficiency of the restoration: I was able to completely disaggregate the amyloids into monomers and then to bring back these monomers in the enzymatically active form.

Finally, I investigated the path of structural changes of the acid-denatured form of phosphoglycerate kinase toward the native and the amyloid state. I have successfully constructed a system where I could determine the direction of structural changes by the modulation of a single parameter: the acidity. Using this system, I concluded that the route of protein structure changes is governed by the energy content of the product (be it amyloid or native protein), that is, the process is under thermodynamic control.

7. Az értekezés témájában megjelent saját közlemények

Agócs G, Szabó BT, Köhler G, Osváth S. (2012) Comparing the folding and misfolding energy landscapes of phosphoglycerate kinase. *Biophys J* 102 (12):2828-34.

Agócs G, Solymosi K, Varga A, Módos K, Kellermayer M, Závodszky P, Fidy J, Osváth S. (2010) Recovery of functional enzyme from amyloid fibrils. *FEBS Lett.* 584 (6):1139-42.

Osváth S, Jäckel M, Agócs G, Závodszky P, Köhler G, Fidy J. (2006) Domain interactions direct misfolding and amyloid formation of yeast phosphoglycerate kinase. *Proteins* 62 (4):909-17.